

Enzymatic preparation of sugar esters - using a deficiency of one component to control the reaction

Patent Number : **WO9902722**

International patents classification : C12P-007/62 C12P-007/64 C12P-019/44 C12N-009/20 C12N-009/50 C12P-019/02 C12P-019/12

• **Abstract :**

WO9902722 A Sugar esters are prepared by an enzymatic process in which an organic solvent, a sugar or sugar derivative an acyl-donating compound and an enzymatic catalyst are introduced into a suitable reactor to form a reaction medium, the quantity of at least one of the components of this reaction mixture being deficient, then in a controlled manner, supplementary quantities of the deficient component are added during the course of the reaction. The sugar esters are then separated from the enzyme particles and the solvent.

USE - Sugar esters have foaming, anti-foaming, fluidising, solubilising and emulsifying properties. They may be used in detergent, cosmetic, pharmaceutical and agrochemical applications.

ADVANTAGE - By limiting the amount of one of the components, the enzymatic reaction is easily controlled, so that the desired product is made with less side reactions. (Dwg.0/0)

• **Publication data :**

Patent Family : WO9902722 A1 19990121 DW1999-10 C12P-019/44 Fre 20p * AP: 1998WO-FR01479 19980708 DSNW: AU CA JP KR US DSRW: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

FR2765888 A1 19990115 DW1999-10 C12P-007/62 AP:

1997FR-0008916 19970709

AU9885461 A 19990208 DW1999-24 C12P-019/44 FD: Based on WO9902722 AP: 1998AU-0085461 19980708

EP1003901 A1 20000531 DW2000-31 C12P-019/44 Fre FD:

Based on WO9902722 AP: 1998EP-0936484 19980708; 1998WO-FR01479 19980708 DSR: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

KR2001021593 A 20010315 DW2001-59 C12P-007/64 AP:

2000KR-0700151 20000107

AU-741812 B 20011213 DW2002-10 C12P-019/44 FD:

Previous Publ. AU9885461; Based on WO9902722 AP: 1998AU-0085461 19980708

US6355455

B1 20020312 DW2002-21 C12P-007/62

FD: Based on WO9902722 AP: 1998WO-FR01479 19980708;

2000US-0462427 20000110

JP2002510212 W 20020402 DW2002-25 C12P-019/44 18p FD:

Based on WO9902722 AP: 1998WO-FR01479 19980708; 1999JP-0508269 19980708

EP1003901 B1 20031112 DW2003-80 C12P-019/44 Fre FD:

Based on WO9902722 AP: 1998EP-0936484 19980708; 1998WO-FR01479 19980708 DSR: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

DE69819738 E 20031218 DW2004-07 C12P-019/44 FD: Based

on EP1003901; Based on WO9902722 AP: 1998DE-6019738

19980708; 1998EP-0936484 19980708; 1998WO-FR01479

19980708

ES2210785 T3 20040701 DW2004-44 C12P-019/44 FD: Based

on EP1003901 AP: 1998EP-0936484 19980708

Priority n° : 1997FR-0008916 19970709

Covered countries : 24

Publications count : 11

• **Patentee & Inventor(s) :**

Patent assignee : (SERO-) LAB SEROBIOLOGIQUES SA

(COGN-) COGNIS FRANCE SA

Inventor(s) : PAULY G; ENGASSER J; GHOUL M

• **Accession codes :**

Accession N° : 1999-120923 [10]

Sec. Acc. n° CPI : C1999-035522

• **Derwent codes :**

Manual code : CPI: B07-A02 C07-A02

B10-A07 C10-A07 D05-A02A D05-H13

D08-B D11-B07 D11-B08 E07-A02 E10-

A07

Derwent Classes : B07 C07 D16 D21 D25

E13

Compound Numbers : 9910-EMO01-K

9910-EMO01-P 9910-EMO01-K 9910-

EMO01-P

• **Update codes :**

Basic update code : 1999-10

Equiv. update code : 1999-10; 1999-24;

2000-31; 2001-59; 2002-10; 2002-21; 2002-

25; 2003-80; 2004-07; 2004-44

Others :

UE4

2001-10; 2002-02; 2002-04; 2003-12; 2004-

01; 2004-07

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12P 19/44, 19/02, 7/64	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/02722 (43) Date de publication internationale: 21 janvier 1999 (21.01.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01479 (22) Date de dépôt international: 8 juillet 1998 (08.07.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/08916 9 juillet 1997 (09.07.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORA- TOIRES SEROBIOLOGIQUES (SOCIÉTÉ ANONYME) [FR/FR]; R-54425 Pulnoy (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): PAULY, Gilles [FR/FR]; 5, rue des Bégonias, F-54000 Nancy (FR). (74) Mandataire: CABINET NUSS; 10, rue Jacques Kablé, F-67080 Strasbourg Cedex (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si des modifications sont</i> <i>reçues.</i>
(54) Title: METHOD FOR ENZYMATIC SYNTHESIS OF SUCROSE ESTERS (54) Titre: PROCEDE DE SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DE SUCROESTERS (57) Abstract <p>The invention concerns a method for the enzymatic synthesis of sucrose esters, characterised in that it consists in introducing, in an adapted reactor and so as to form a reaction medium, predetermined amounts of an organic solvent, a sugar or a sugar derivative, a compound donor of acyl groups and an enzymatic catalyst, the amount of at least one constituent of the reaction mixture being deficient, in controlled addition during the reaction of additional amounts of the deficient constituent(s), and finally, in purifying the resulting sucrose esters at least by separating the enzymatic particles from the solvent.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet un procédé de synthèse enzymatique de sucroesters. Procédé caractérisé en ce qu'il consiste à introduire, dans un réacteur adapté et de manière à former un milieu réactionnel, des quantités déterminées d'un solvant organique, d'un sucre ou d'un dérivé de sucre, d'un composé donneur d'acyles et d'un catalyseur enzymatique, la quantité d'au moins un des constituants dudit milieu réactionnel étant déficitaire, à ajouter de manière contrôlée au cours de la réaction des quantités supplémentaires du ou des constituant(s) déficitaire(s) et, enfin, à purifier les sucroesters produits au moins par séparation des particules enzymatiques et du solvant.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Procédé de synthèse enzymatique de sucroesters

La présente invention concerne le domaine des procédés de synthèse de substances et a pour objet un procédé de synthèse enzymatique de sucroesters.

Les sucroesters sont des tensioactifs résultant de la combinaison par liaison ester d'un sucre et d'un acide gras. En variant la nature du sucre et la longueur de la chaîne grasse, il est possible d'obtenir un ensemble de molécules possédant une gamme très large de balances hydrophile-lipophile et donc de propriétés fonctionnelles. On peut ainsi produire des tensioactifs moussants, peu-moussants, fluidifiants, solubilisants ou émulsionnants.

Ces produits constituent des ingrédients naturels intéressant les secteurs de la détergence, de la cosmétique, de la pharmacie et de l'agro-alimentaire.

Les sucroesters commercialisés actuellement sont généralement produits par synthèse chimique.

Ce sont généralement des mélanges complexes de différents composés, résultant de la non spécificité des réactions chimiques de condensation entre les sucres et les acides gras. Les températures et pressions élevées nécessaires pour ces réactions conduisent donc également à des réactions parasites et des phénomènes de coloration des produits.

Les sucroesters peuvent aussi être obtenus par des réactions de condensation catalysées par des enzymes, par exemple des lipases. Ces réactions enzymatiques ont l'avantage d'être plus spécifiques que les synthèses chimiques et de se dérouler à des températures et des pressions ordinaires.

SEINO et al ont proposé (J. Am Oil Chem. Soc. 61, 1761-1765, 1984) d'estérifier des sucres (sucrose, glucose, fructose, sorbitol) avec des acides gras (acide stéarique, oléique, linoléique) en présence d'une enzyme dans un milieu aqueux. Mais cette technologie ne permet pas d'obtenir de quantités significatives de sucroesters.

En outre, les documents WO 90/09451 et WO 94/01575 décrivent des procédés d'obtention de sucroesters en absence totale d'eau et sans utilisation de solvant. Cette technologie nécessite cependant une alkylation préalable des sucres pour permettre leur solubilisation dans la phase grasse. Cette technologie de production d'esters d'alkylsucres et d'acides gras présente aussi l'inconvénient de conduire à une préparation contenant un excès de matière grasse non transformée et donc de nécessiter des opérations complexes de purification si on

- 2 -

veut obtenir des niveaux de pureté élevés pour les sucroesters résultants. Par ailleurs, la viscosité élevée des milieux réactionnels utilisés complique la mise en oeuvre des opérations.

5 ZAKS A. et KLIBANOV A.M. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3192-3196, 1985) ont décrit, en premier, la synthèse enzymatique de sucroesters d'acides gras dans un solvant organique. Cependant, la pyridine utilisée est un solvant toxique prohibé pour des applications industrielles.

10 De plus, l'utilisation de solvants organiques de type alcools tertiaires pour réaliser les synthèses enzymatiques de sucroesters a également déjà été proposée.

15 Ainsi, le document FR-A-2 646 439 et KHALED et al (Biotech. Letters, 13, 167-172, 1991) décrivent les synthèses d'oléate de fructose, de sorbose, de sorbitol et de mannitol, ainsi que de palmitate de fructose en utilisant une lipase immobilisée et le méthyl-2 butanol-2 comme solvant. Toutefois, les performances de ces procédés de synthèse demeurent peu élevées : des concentrations finales de sucroesters de l'ordre de 20 g/l, des rendements de conversion des sucres ne dépassant pas 50 % et des productivités spécifiques inférieures à 0,01 g de sucroesters produits par heure et par gramme de catalyseur. En outre, les excès d'acides gras utilisés nécessitent des opérations complexes de fractionnement des mélanges de sucroesters et de corps gras obtenus.

20 Par ailleurs, DUCRET et al (Biotechnol. Bioeng. 48, 214-221, 1995) décrivent la synthèse, par une lipase immobilisée d'oléate de fructose et de glucose dans du méthyl-2 butanol-2, en maintenant un vide partiel au dessus du milieu réactionnel. Cette technologie conduit à des degrés de conversion plus élevés de 25 93 % pour l'oléate de fructose et de 70 % pour l'oléate de glucose. Cependant, les concentrations finales de sucroesters demeurent peu élevées (23 g/l pour l'oléate de fructose, 17g/l pour l'oléate de glucose), et les productivités spécifiques sont inférieures à 0,1 g de sucroester par heure et par gramme de catalyseur. En outre, cette technologie ne donne pas de synthèse d'esters de saccharose et de lactose.

30 Enfin, WOUDEMBERG et al (Biotechnol. Bioeng. 49, 328-333, 1996) décrivent des estérifications enzymatiques de disaccharides, comme le sucrose, avec de l'éthylbutanoate et de l'éthylododécanoate en utilisant une lipase immobilisée et le méthyl-2 butanol-2 comme solvant. Mais les concentrations finales et les productivités (0,04 g/h.g) spécifiques obtenues sont très faibles.

35 La présente invention a notamment pour but de pallier l'ensemble des inconvénients précités et de proposer un procédé de synthèse enzymatique de sucroesters qui, comparé aux procédés connus précédemment mentionnés, permet

- 3 -

d'atteindre des performances nettement supérieures en termes de concentrations finales de sucroesters, de rendements de conversions (à la fois pour les sucres et pour les corps gras présents à l'origine) et de productivités spécifiques, tout en réduisant les opérations complexes et fastidieuses de purification après synthèse.

5 A cet effet, la présente invention a pour objet un procédé de synthèse enzymatique de sucroesters, caractérisé en ce qu'il consiste à introduire, dans un réacteur adapté et de manière à former un milieu réactionnel, des quantités déterminées d'un solvant organique, d'un sucre ou d'un dérivé de sucre, d'un composé donneur d'acyles et d'un catalyseur enzymatique, la quantité d'au moins
10 un des constituants dudit milieu réactionnel étant déficitaire, à ajouter de manière contrôlée au cours de la réaction des quantités supplémentaires du ou des constituant(s) déficitaire(s) et, enfin, à purifier les sucroesters produits au moins par séparation des particules enzymatiques (par exemple par décantation, filtration ou centrifugation) et du solvant (par exemple par évaporation, distillation ou
15 filtration membranaire).

Le procédé selon l'invention consiste plus précisément, durant le déroulement de la réaction de synthèse, à ajouter au milieu réactionnel, de façon continue ou intermittente, des quantités additionnelles déterminées de sucre ou de dérivé de sucre, sous forme solide ou sous forme de solution liquide, de solvant,
20 de catalyseur enzymatique sous forme soluble ou immobilisée et/ou de composé donneur d'acyles, seul ou solubilisé dans le solvant.

Ainsi, la différence principale entre le procédé selon l'invention et les procédés connus précédemment décrits réside dans la conduite de la réaction enzymatique.

25 En effet, dans les procédés de synthèse enzymatique de sucroesters connus, la totalité des quantités des constituants du milieu réactionnel est introduite dans le réacteur en début de réaction.

Or, selon l'invention, seule une quantité initiale déterminée d'un ou de plusieurs des constituants du milieu réactionnel est initialement introduite dans
30 le récipient de réaction et des quantités supplémentaires du ou des constituants partiellement introduits à l'origine sont ajoutées au cours du déroulement de la réaction de synthèse.

En contrôlant la quantité des réactifs additionnés, il est possible de commander l'évolution au cours du temps de la composition du milieu réactionnel
35 et, par ce biais, d'orienter la réaction enzymatique vers une production maximale de monoesters et/ou de diesters, en limitant les réactions parasites.

- 4 -

Conformément à l'invention, la conduite de la réaction est menée de manière à limiter en premier lieu les phénomènes d'inhibition de la réaction enzymatique que l'on observe en présence de fortes concentrations de sucres ou de donneurs d'acyles.

5 Ainsi, il a été constaté que, en vue d'obtenir une concentration finale élevée en sucroesters, il est préférable de ne pas introduire initialement dans le réacteur l'ensemble des quantités de réactifs nécessaires, mais au contraire de les apporter progressivement, de manière contrôlée, au cours du déroulement de la réaction en évitant d'atteindre des niveaux de concentration inhibitrice de la
10 réaction enzymatique.

La conduite de la réaction est menée de manière à contrôler tout au long de son déroulement le rapport molaire [sucre(s) ou dérivé(s) de sucre(s)/ donneur d'acyle(s)].

De manière avantageuse, ce rapport molaire peut être compris entre
15 0,01 et 10,00, préférentiellement entre 0,02 et 2,00, en fonction des composants formant le couple sucre(s) ou dérivé(s) de sucre(s)/ donneur d'acyle(s) concerné.

En fixant dans le milieu réactionnel des valeurs de rapport molaire contenues dans les plages précitées, il est possible d'obtenir soit des vitesses de réaction plus élevées, soit des proportions maximales de monoesters ou de diesters
20 de sucres.

Ce rapport molaire pourra, en contrôlant les natures et les quantités de réactifs ajoutées au cours du temps, soit être maintenu à une valeur constante au cours de toute la durée de la réaction, soit être soumis à une variation contrôlée de manière à suivre un profil de variation déterminé au cours du temps, tout en
25 étant compris dans la fourchette de valeurs précitée tout au long de la réaction.

En vue d'optimiser le déroulement de la réaction de synthèse, il est possible de procéder éventuellement à un soutirage intermittent ou continu d'au moins un des constituants du milieu réactionnel, le ou lesdits constituant(s) soutiré(s) pouvant éventuellement être réintroduit(s) dans le réacteur après
30 fractionnement.

Selon un mode de réalisation de l'invention, il peut être prévu de réaliser un soutirage intermittent ou continu du milieu réactionnel complet, un ou plusieurs constituant(s) dudit milieu soutiré pouvant être réinjecté(s) dans le réacteur après fractionnement.

35 Le récipient de réaction ou réacteur utilisé pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention est avantageusement équipé d'une régulation de

- 5 -

température, d'une régulation de pression, de moyens d'ajout de réactifs et de moyens de soutirage de produits.

Au cours du déroulement de la réaction de synthèse, la température est avantageusement régulée entre 20° C et 100° C, la pression partielle au-dessus
5 du milieu réactionnel est avantageusement régulée entre 10 mbars (10^3 Pa) et 1000 mbars (10^5 Pa) et ledit milieu réactionnel est avantageusement soumis à une agitation douce.

En vue d'obtenir des préparations résultant de sucroesters présentant des puretés élevées, il peut en outre être prévu de mettre en oeuvre des opérations
10 finales supplémentaires de fractionnement, par exemple, en éliminant les sucres ou les corps gras résiduels par extraction par des solvants organiques ou par des fluides supercritiques ou en fractionnant les monoesters et/ou diesters produits par précipitations(s) ou séparation(s) chromatographique(s).

Le sucre ou dérivé de sucre utilisé dans le cadre de la présente
15 invention peut consister en un composé quelconque répondant aux types précités, en particulier les composés de la famille des oses.

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, le sucre ou le dérivé de sucre est choisi dans le groupe formé par le fructose, le glucose, le saccharose, le tréhalose, les dérivés éthylés et méthylés de ces sucres et les
20 composés structurellement analogues, tels que les polyols.

Le composé donneur d'acyle(s) est choisi parmi les acides gras connus et peut être préférentiellement sélectionné dans le groupe formé par les acides gras, saturés ou insaturés, à nombre pair ou impair d'atomes de carbones, linéaires ou branchés et dont le nombre d'atomes de carbones est supérieur à 4, les
25 esters d'acides gras, les monoglycérides, diglycérides, triglycérides et les huiles.

En tant que solvant organique, il est possible d'utiliser tout composé organique ou tout mélange de composés organiques permettant une solubilisation totale ou partielle des sucres ou dérivés de sucres et des donneurs d'acyle(s) choisis.

Ainsi, le ou les solvant(s) pourront être notamment sélectionnés
30 parmi les substances suivantes : méthanol, éthanol, propanol, butanol, acétone, propanone, butanone, pentanone 2, 1,2 éthanediol, 2,3 butanediol, dioxane, acétonitrile, méthyl 2 butanol 2, tertibutanol, méthyl-2-propanol et hydroxy-4-méthyl-2-pentanone, ou un mélange de deux ou de plusieurs de ces solvants.

Le catalyseur enzymatique mis en oeuvre doit bien entendu induire et
35 favoriser le transfert d'un groupement acyle d'un donneur d'acyle(s) à un sucre ou

- 6 -

un dérivé de sucre et peut consister avantageusement en une protéase ou une lipase, préférentiellement immobilisée sur un support.

Compte tenu des différentes caractéristiques mentionnées ci-dessus, plusieurs variantes de réalisation de l'invention peuvent être envisagées, fonction
5 notamment de la nature des réactifs utilisés et des buts privilégiés à atteindre.

Ainsi, il est possible, selon une première variante de réalisation, d'envisager un procédé de synthèse avec ajout de donneur d'acyle et de solvant au cours de la réaction.

Dans ce cas, le réacteur contient initialement le solvant, la quantité
10 totale de sucre ou de dérivé de sucre (généralement entre 10 g/l et 200 g/l) nécessaire pour obtenir la quantité finale de sucroester souhaitée, la quantité de donneur d'acyle correspondant au rapport molaire (sucre dissout/donneur d'acyle) initial recherché (généralement entre 1 g/l et 500 g/l) et l'enzyme apportée sous
15 forme soluble ou immobilisée (de 1 g/l à 100 g/l, préférentiellement entre 5 g/l et 20 g/l).

Au cours du déroulement de la réaction, on ajoute, d'une part, du solvant de manière à compenser les pertes par évaporation et à maintenir une quantité de solvant relativement constante et, d'autre part, du donneur d'acyle en
20 quantité par unité de temps adaptée pour maintenir le rapport molaire (sucre dissout/donneur d'acyle) à la valeur recherchée.

Ainsi, lorsqu'il est avantageux de maintenir ce rapport molaire constant tout au long de la réaction, le donneur d'acyle est ajouté à une vitesse égale à sa vitesse de consommation par la réaction, cette vitesse de consommation pouvant être déterminée par une étude cinétique préalable de la réaction
25 enzymatique mise en oeuvre. La quantité par unité de temps de donneur d'acyle à ajouter au cours de la réaction est généralement comprise entre 0,01 et 10 grammes de donneur d'acyle par heure et par gramme de catalyseur enzymatique présent dans le réacteur.

Conformément à une seconde variante de réalisation de l'invention,
30 le procédé de synthèse peut également être effectué avec ajout de sucre et de solvant.

Dans ce second cas, le réacteur contient initialement le solvant, la quantité totale de donneur d'acyle (généralement entre 1 g/l et 500 g/l) nécessaire pour obtenir la quantité finale de sucroester souhaitée, la quantité de sucre ou de
35 dérivé de sucre correspondant au rapport molaire (sucre dissout/donneur d'acyle) initial recherché (généralement entre 1 g/l et 200 g/l) et l'enzyme apportée sous

- 7 -

forme soluble ou immobilisée (de 1 g/l à 100 g/l, préférentiellement entre 5 g/l et 20 g/l).

5 Au cours du déroulement de la réaction, on ajoute, d'une part, du solvant de manière à compenser les pertes par évaporation et à maintenir une quantité de solvant relativement constante et, d'autre part, du sucre ou du dérivé de sucre en quantité par unité de temps adaptée pour maintenir le rapport molaire (sucre dissout/donneur d'acyle) à la valeur recherchée.

10 Ainsi, lorsqu'il est avantageux de maintenir ce rapport molaire constant tout au long de la réaction, le sucre ou dérivé de sucre est ajouté à une vitesse égale à sa vitesse de consommation par la réaction, cette vitesse de consommation pouvant être déterminée par une étude cinétique préalable de la réaction enzymatique mise en oeuvre. La quantité par unité de temps de sucre ou de dérivé de sucre à ajouter au cours de la réaction est généralement comprise entre 0,01 et 10 grammes de sucre ou de dérivé de sucre par heure et par gramme
15 de catalyseur enzymatique présent dans le réacteur.

 Selon une troisième variante de réalisation de l'invention, le procédé de synthèse peut également être effectué en ajoutant du sucre (ou du dérivé de sucre), du donneur d'acyle et du solvant.

20 Dans ce troisième cas, le réacteur contient initialement le solvant, le sucre à une concentration variable (de préférence supérieure à la solubilité du sucre dans le solvant) et la quantité de donneur d'acyle correspondant au rapport molaire (sucre dissout/donneur d'acyle) initial recherché, ainsi que l'enzyme apportée sous forme soluble ou immobilisée.

25 Au cours du déroulement de la réaction, on procède, d'une part, à l'ajout de solvant en vue de compenser les pertes par évaporation et, d'autre part, à l'ajout de sucre (ou de dérivé de sucre) et de donneur d'acyle en quantités par unités de temps déterminées de manière à maintenir le rapport molaire de ces deux constituants à la valeur recherchée.

30 Lorsqu'il est avantageux de maintenir ce rapport molaire constant tout au long de la réaction, le sucre (ou dérivé de sucre) et le donneur d'acyle sont ajoutés en des quantités par unités de temps respectivement égales à leurs vitesses de consommation par la réaction, ces vitesses de consommation pouvant être déterminées par une étude cinétique préalable de la réaction enzymatique mise en oeuvre.

35 Conformément à une quatrième variante de réalisation de l'invention, le procédé de synthèse continu peut également être conduit avec ajout et soutirage

- 8 -

de sucre (ou de dérivé de sucre), de donneur d'acyle, et/ou de solvant, ainsi qu'éventuellement de catalyseur enzymatique.

Dans ce quatrième cas, le réacteur contient initialement le solvant, le sucre à une concentration variable (de préférence supérieure à la solubilité du sucre dans le solvant) et la quantité de donneur d'acyle correspondant au rapport molaire (sucre dissout/donneur d'acyle) initial recherché, ainsi que l'enzyme apportée sous forme soluble ou immobilisée.

Au cours du déroulement de la réaction, on soutire de façon continue ou intermittente du milieu réactionnel, l'enzyme pouvant être retenue à l'intérieur du réacteur lorsqu'il est sous forme immobilisée.

Après séparation, le solvant, et éventuellement le sucre et/ou le donneur d'acyle, peuvent être recyclés dans le réacteur.

Tout au long du déroulement de la réaction, on procède, d'une part, à l'ajout de solvant en vue de compenser les pertes par évaporation et par soutirage et, d'autre part, à l'ajout de sucre (ou de dérivé de sucre) et de donneur d'acyle en quantités par unités de temps déterminées de manière à maintenir le rapport molaire de ces deux constituants à la valeur recherchée.

Lorsqu'il est avantageux de maintenir ce rapport molaire constant tout au long de la réaction, le sucre (ou dérivé de sucre) et le donneur d'acyle sont ajoutés en des quantités par unités de temps respectivement égales à leurs vitesses de consommation par la réaction et de soutirage.

A titre d'exemples non limitatifs, on décrira ci-après différents modes de réalisation pratiques de l'invention.

Exemple 1 : Production d'oléate de fructose avec ajout intermittent de fructose

On introduit initialement dans un réacteur en verre 1 litre de méthyl-2 butanol-2, 25 grammes de fructose, 106 grammes d'oléate de méthyle et 5 grammes de particules de lipase immobilisées du type connu sous la désignation commerciale Novozym. La température du réacteur est réglée à 60° C, la pression à 200 mbars (2×10^4 Pa), et l'agitation à 200 rpm (rotations par minute). Après 8 heures de réaction, on ajoute 25 grammes de fructose, et après 16 heures de réaction, on ajoute à nouveau 25 grammes de fructose. Le rapport molaire fructose/oléate de méthyle, initialement fixé à une valeur de 0,38, est maintenu au cours de la réaction entre 0,12 et 5,00.

Au cours du déroulement de la réaction de synthèse, on obtient les productions suivantes d'oléate de fructose :

- 9 -

- après 8 heures de réaction, on relève 45 g/l de monoester et 5 g/l de diester. Ceci correspond à une conversion globale de 78 % du fructose et une productivité spécifique de 1,2 g de sucroester par heure et par gramme de particules enzymatiques.

5 - après 16 heures de réaction, on relève 65 g/l de monoester et 10 g/l de diester. Ceci correspond à une conversion globale de 58 % du fructose et une productivité spécifique de 0,9 g de sucroester par heure et par gramme de particules enzymatiques.

10 - après 20 heures de réaction, on relève 80 g/l de monoester et 10 g/l de diester. Ceci correspond à une conversion globale de 46 % du fructose et une productivité spécifique de 0,9 g de sucroester par heure et par gramme de particules enzymatiques.

Exemple 2 : Production d'oléate de fructose avec ajout continu de fructose et d'oléate de méthyle

15 On introduit initialement dans un réacteur en verre 500 ml de méthyl-2 butanol-2, 5 grammes de fructose, 8,3 grammes d'oléate de méthyle et 10 grammes de particules de lipase immobilisées du type connu sous la désignation commerciale Novozym. La température du réacteur est réglée à 60° C, la pression à 200 mbars (2×10^4 Pa), et l'agitation à 200 rpm (rotations par minute). Au cours de la réaction, on ajoute avec un débit de 1 ml/mn une solution
20 de méthyl-2 butanol-2 renfermant 55 mM de fructose et 55 mM d'oléate de méthyle. Le rapport molaire fructose/oléate de méthyle, initialement fixé à une valeur de 1,0, est maintenu au cours de la réaction entre 0,5 et 1,5.

25 Après 20 heures de réaction, on obtient 40 grammes de monoester d'oléate de fructose, sans quantité détectable de diester. Ceci correspond à une conversion globale de 95 % du fructose et de 95 % de l'oléate de méthyle, et une productivité spécifique de 0,15 gramme de sucroester par heure et par gramme de particules enzymatiques.

30 Exemple 3 : Production d'oléate de fructose avec ajout continu d'oléate de méthyle

35 On introduit initialement dans un réacteur en verre 500 ml de méthyl-2 butanol-2, 12,5 grammes de fructose, 8,3 grammes d'oléate de méthyle et 10 grammes de particules de lipase immobilisées du type connu sous la désignation commerciale Novozym. La température du réacteur est réglée à 60° C, la pression à 200 mbars (2×10^4 Pa), et l'agitation à 200 rpm (rotations par minute). Au cours de la réaction, on ajoute avec un débit de 0,66 ml/mn une solution de méthyl-2 butanol-2 renfermant 206 mM d'oléate de méthyle. Le

- 10 -

rapport molaire fructose/oléate de méthyle, initialement fixé à une valeur de 2,0, est maintenu au cours de la réaction entre 1,0 et 2,0.

Après 18 heures de réaction, on obtient 60 grammes de monoester d'oléate de fructose, sans quantité détectable de diester. Ceci correspond à une conversion globale de 95 % du fructose et de 95 % de l'oléate de méthyle, et une productivité spécifique de 0,3 gramme de sucroester par heure et par gramme de particules enzymatiques.

Exemple 4 : Production de pélargonate de tréhalose avec un ajout continu d'acide pélargonique

On introduit initialement dans un réacteur en verre 465 ml de méthyl-2 butanol-2, 14 grammes de tréhalose, 72 mmole d'acide pélargonique et 10 grammes de particules de lipase immobilisées du type connu sous la désignation commerciale Novozym. La température du réacteur est réglée à 60° C, la pression à 200 mbars (2×10^4 Pa), et l'agitation à 200 rpm (rotations par minute). Au cours de la réaction et pendant 12 heures consécutives, on ajoute avec un débit de 0,66 ml/mn, un mélange de 32 ml de méthyl-2 butanol-2 et de 468 ml d'acide pélargonique. Le rapport molaire fructose/acide pélargonique, initialement fixé à une valeur de 0,09, est maintenu au cours de la réaction entre 0,01 et 0,09.

Après 18 heures de réaction, on obtient 3 grammes de monoester de pélargonate de tréhalose et 22 g/l de diester. Ceci correspond à une conversion globale de 53 % du tréhalose et de 3 % de l'acide pélargonique, et une productivité spécifique de 0,13 gramme de sucroester par heure et par gramme de particules enzymatiques.

Après 48 heures de réaction, on obtient 2 grammes de monoester de pélargonate de tréhalose et 25 g/l de diester. Ceci correspond à une conversion globale supérieure à 98 % du tréhalose et de 3 % de l'acide pélargonique, et une productivité spécifique de 0,06 gramme de sucroester par heure et par gramme de particules enzymatiques.

Comme le montrent à titre illustratif les différents exemples décrits ci-dessus, le procédé de synthèse enzymatique de sucroesters selon l'invention présente de nombreux avantages par rapport aux procédés similaires connus et permet notamment d'atteindre les performances suivantes, résultant en particulier en des avantages économiques notables :

- des concentrations finales de sucroesters pouvant atteindre 90 g/l ;
- des rendements de conversion supérieurs à 95 %, à la fois pour le sucre ou dérivés de sucres et le composé donneur d'acyle(s) ;

- 11 -

- des sélectivités de réaction soit de plus de 99 % de monoesters, soit de plus de 90 % de diesters ;
- des productivités spécifiques allant jusqu'à 0,7 g de sucroesters par heure et par gramme de particules enzymatiques.

5 En plus des performances précitées, il convient également de noter que, grâce à l'invention, on obtient une composition bien définie en sucroesters et donc une qualité de produits supérieure.

10 En outre, l'absence de réactions parasites et de phénomènes de coloration aux températures utilisées (généralement autour de 60° C) permet de minimiser les opérations de purification et la génération d'effluents, améliorant d'avantage encore la compétitivité économique du procédé selon l'invention.

15 Enfin, ce dernier se distingue également des procédés connus par sa très grande polyvalence, qui autorise son application à une gamme très large de sucres (monosaccharides et disaccharides) et donneurs d'acyles (acides gras, esters d'acides gras, huiles, esters d'huiles) et, par voie de conséquence, la génération d'une gamme très large de nouveaux sucroesters.

20 Bien entendu, l'invention n'est pas limitée au mode de réalisation décrit. Des modifications restent possibles, notamment du point de vue de la constitution des divers éléments ou par substitution d'équivalents techniques, sans sortir pour autant du domaine de protection de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Procédé de synthèse enzymatique de sucroesters, caractérisé en ce qu'il consiste à introduire, dans un réacteur adapté et de manière à former un milieu réactionnel, des quantités déterminées d'un solvant organique, d'un sucre ou d'un dérivé de sucre, d'un composé donneur d'acyles et d'un catalyseur enzymatique, la quantité d'au moins un des constituants dudit milieu réactionnel étant déficitaire, à ajouter de manière contrôlée au cours de la réaction des quantités supplémentaires du ou des constituant(s) déficitaire(s) et, enfin, à purifier les sucroesters produits au moins par séparation des particules enzymatiques et du solvant.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter au milieu réactionnel, de façon continue ou intermittente, des quantités additionnelles déterminées de sucre ou de dérivé de sucre, sous forme solide ou sous forme de solution liquide, de solvant, de catalyseur enzymatique sous forme soluble ou immobilisée et/ou de composé donneur d'acyles, seul ou solubilisé dans le solvant.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il consiste à procéder à un soutirage intermittent ou continu d'au moins un des constituants du milieu réactionnel, le ou lesdits constituant(s) soutiré(s) étant réintroduit(s) dans le réacteur après fractionnement.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il consiste à réaliser un soutirage intermittent ou continu du milieu complet, un ou plusieurs constituant(s) dudit milieu soutiré étant réinjecté(s) dans le réacteur après fractionnement.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il consiste à contrôler le rapport molaire [sucre(s) ou dérivé(s) de sucre(s)/donneur d'acyle(s)] dans le milieu réactionnel, de telle manière que ce rapport molaire soit compris entre 0,01 et 10,00, préférentiellement entre 0,02 et 1,00, tout au long du déroulement dudit procédé, ce en fonction des composants du couple sucre(s) ou dérivé(s) de sucre(s)/donneur d'acyle(s) concerné.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que, au cours de la réaction, la température est régulée entre 20° C et 100° C, la pression partielle au-dessus du milieu réactionnel est régulée entre 10 mbars et 1000 mbars et ledit milieu réactionnel est soumis à une agitation douce.

- 13 -

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il consiste à éliminer les sucres ou les corps gras résiduels par extraction par des solvants organiques ou par des fluides supercritiques.

5 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il consiste à fractionner les monoesters et/ou diesters produits par précipitations(s) ou séparation(s) chromatographique(s).

10 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le sucre ou le dérivé de sucre est choisi dans le groupe formé par le fructose, le glucose, le saccharose, le tréhalose, les dérivés éthylés et méthylés de ces sucres et les composés structurellement analogues, tels que les polyols.

15 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le composé donneur d'acyle(s) est choisi dans le groupe formé par les acides gras, saturés ou insaturés, à nombre pair ou impair d'atomes de carbones, linéaires ou branchés et dont le nombre d'atomes de carbones est supérieur à 4, les esters d'acides gras, les monoglycérides, diglycérides, triglycérides et les huiles.

20 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le solvant organique consiste en un solvant choisi dans le groupe formé par le méthanol, l'éthanol, le propanol, le butanol, l'acétone, le propanone, le butanone, le pentanone 2, le 1,2 éthanediol, le 2,3 butanediol, le dioxane, l'acétonitrile, le méthyl 2 butanol 2, le tertibutanol, le méthyl-2-propanol et l'hydroxy-4-méthyl-2-pentanone, ou un mélange de deux ou de plusieurs de ces solvants.

25 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le catalyseur enzymatique consiste en une protéase ou une lipase, préférentiellement immobilisée sur un support.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/01479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12P19/44 C12P19/02 C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 507 323 A (LION CORP) 7 October 1992 see page 21; claims ---	1
A	EP 0 413 307 A (LION CORP) 20 February 1991 see page 20; claims ---	1
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9737 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 97-397039 XP002060488 & JP 09 173091 A (LION CORP), 8 July 1997 see abstract --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 October 1998

Date of mailing of the international search report

10/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 98/01479

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9734 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 97-367073 XP002060489 & JP 09 154595 A (LION CORP), 17 June 1997 see abstract</p> <p>---</p>	1
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9402 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 94-011028 XP002060490 & JP 05 317064 A (KAO CORP) , 3 December 1993 see abstract</p> <p>---</p>	1
A	<p>EP 0 087 404 A (SORIGONA AB) 31 August 1983 see claims</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01479

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0507323 A	07-10-1992	DE 69217099 D	13-03-1997
		DE 69217099 T	28-05-1997
		JP 5112592 A	07-05-1993
		JP 5176783 A	20-07-1993
		JP 5148285 A	15-06-1993
EP 0413307 A	20-02-1991	JP 4016196 A	21-01-1992
		JP 3076593 A	02-04-1991
EP 0087404 A	31-08-1983	SE 439647 B	24-06-1985
		JP 58155097 A	14-09-1983
		SE 8201021 A	19-08-1983

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Inde internationale No

PCT/FR 98/01479

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12P19/44 C12P19/02 C12P7/64

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 507 323 A (LION CORP) 7 octobre 1992 voir page 21; revendications ---	1
A	EP 0 413 307 A (LION CORP) 20 février 1991 voir page 20; revendications ---	1
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9737 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 97-397039 XP002060488 & JP 09 173091 A (LION CORP) , 8 juillet 1997 voir abrégé ---	1



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 octobre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/11/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Delanghe, L

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D .nde Internationale No

PCT/FR 98/01479

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9734 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 97-367073 XP002060489 & JP 09 154595 A (LION CORP), 17 juin 1997 voir abrégé</p> <p>----</p>	1
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9402 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 94-011028 XP002060490 & JP 05 317064 A (KAO CORP) , 3 décembre 1993 voir abrégé</p> <p>----</p>	1
A	<p>EP 0 087 404 A (SORIGONA AB) 31 août 1983 voir revendications</p> <p>-----</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document internationale No

PCT/FR 98/01479

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0507323 A	07-10-1992	DE 69217099 D	13-03-1997
		DE 69217099 T	28-05-1997
		JP 5112592 A	07-05-1993
		JP 5176783 A	20-07-1993
		JP 5148285 A	15-06-1993
EP 0413307 A	20-02-1991	JP 4016196 A	21-01-1992
		JP 3076593 A	02-04-1991
EP 0087404 A	31-08-1983	SE 439647 B	24-06-1985
		JP 58155097 A	14-09-1983
		SE 8201021 A	19-08-1983

THIS PAGE BLANK (USPTO)